

Az *nm23-H1/H2* ortológ *ndk-1* szerepe a *C. elegans* egyedfejlődésében

Doktori értekezés tézisei

Fancsalszky Luca



Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola
Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Erdei Anna akadémikus
Programvezető: Prof. Dr. Vellai Tibor egyetemi tanár
Témavezető: dr. Vellainé Takács Krisztina docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Genetikai Tanszék
Budapest
2014

BEVEZETÉS

Az *nm23* (non-metastatic clone 23) vagy más néven Nme (expressed in non-metastatic cell) család ősi génje a törzsfajlás korai szakaszában kialakult, és szerepének fontosságát támasztja alá, hogy az élőlények mindhárom doménjében (Eubacteria, Archaea, és Eucarya) képviselteti magát. A legtöbb paralógot a humán genom tartalmazza, jelenlegi ismereteink alapján tíztagú a géncsalád. Két csoportja közül az elsőbe tartozók (*nm23-H1-H4*) kivétel nélkül nukleozid-difoszfát kinázokat (NDPK) kódolnak. A második csoport (*nm23-H5-H10*) tagjai sokkal jobban különböznek egymástól, mint az elsőbe tartozók. Doménjeik tekintetében is nagyfokú különbözőséget mutatnak, és az NM23-H6 kivételével egyikük sem rendelkezik kináz aktivitással. A leginkább tanulmányozott, első csoportba tartozó NDPK enzimek ATP felhasználásával, egy erősen konzervált foszfo-hisztidin (H118) intermediéren keresztül közvetítenek egy foszfát csoportot különböző dinukleotidok irányába, de emellett fehérjéket is képesek foszforilálni. Az elsőként azonosított metasztázis inhibitor, az NM23-H1 is a NDPK-ok közé tartozik. Emlősökben jelenlegi ismereteink szerint az NM23 fehérjecs család az egyetlen, mely hisztidin-kináz aktivitással rendelkezik.

A NDPK-ok funkciója szerteágazó, ami magyarázatul szolgálhat a különböző fajokban megfigyelt pleiotróp hatásokra. Egyaránt kimutatták már a család génjeinek szerepét – több különböző funkciója mellett – sejt migrációban, növekedésben és differenciációban is. Ezek az eredmények magyarázatul szolgálhatnak arra, hogy miért hozzák újra és újra kapcsolatba az NM23-H1 fehérjét a metasztázis gátlással, holott a mai napig nem értjük pontosan, hogyan fejt ki ezt a hatását. Ahhoz, hogy tisztábban lássuk a folyamatokat, amelyek a metasztázis szuppresszióhoz vezet(het)nek, egy modellállatban tanulmányoztuk az NM23-H1 ortológját. A redundáns funkciók esetünkben elhanyagolhatóak például az egérben tapasztaltakhoz képest, ugyanis a *Caenorhabditis elegans* nematóda genomja mindössze egy, első csoportba sorolható *nm23* ortológot kódol, az NDK-1 (nucleoside diphosphate kinase-1) fehérjét.

CÉLKITŰZÉSEK

A rákos sejtek proliferációjában, illetve metasztatikus potenciáljuk csökkentésében részt vevő gének intenzív kutatások központjai. Így az *nm23* gének vizsgálata is egyre szélesebb körű. A humán sejtvonalakon végzett kísérletek mellett újabb és újabb genetikai modell organizmusokban (pl. egér, *Drosophila*, *Xenopus*) is tanulmányozzák fejlődésgenetikai szerepüket. Azonban *Caenorhabditis elegans*ban kutatócsoportunkon kívül még nem végzett senki ilyen típusú vizsgálatot.

Az NM23 metasztázis inhibitor hatása mögött rejlő pontos mechanizmusok nem ismertek. Bár többféle folyamatban, jelátviteli útvonalban tulajdonítanak neki szerepet, számos kölcsönható fehérje partnerét határozták meg, ezek közül kevés nyert *in vivo* modellben is megerősítést.

Humán sejtvonalakon végzett kutatások azt mutatták, hogy az NM23-H1 és a KSR1 (kinase suppressor of Ras) állványfehérje között fizikai interakció van. Továbbá, hogy az NM23-H1 foszforilálja a KSR1-et, ami a Ras/ERK jelátvitel gátlását eredményezi, ezen keresztül biztosítva a metasztázis szuppresszor funkcióját. Bizonyos típusú tumorokban azonban, mint pl. petefészekrákban, úgy tűnik, hogy az NM23 onkogén tulajdonságokkal bír. Azért, hogy közelebb kerüljünk ezen látszólagos ellentmondások feloldásához, fontos minél több folyamatban és szövetben megvizsgálni az *nm23* gén működését.

A doktori munkám célja az volt, hogy az *ndk-1* gén fejlődésbiológiai szerepének vizsgálata által jobban megérthessük az NM23 rákos sejtek proliferációjára és metasztatikus potenciáljának csökkentésére gyakorolt hatását. Ezért két – egyelőre különállónak tűnő – folyamatnak szenteltem kitüntetett figyelmet: miként hat 1. az *ndk-1* a *C. elegans* vulva fejlődésére az EGFR/Ras/MAPK jelátviteli útvonalban, illetve 2. a *C. elegans* gonád disztális csúcsi sejtjeinek (DTC-k) migrációjára valamint a citoskeleton átrendeződésére.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Törzsfenntartás

A *C. elegans* törzseket laboratóriumi körülmények között 15°C és 25°C között, Petri csészékbe öntött NGM (*Nematoda Growth Medium*) táptalajon növesztett *Escherichia coli* OP50 baktériumpázsiton tartottuk.

Mikroszkópia

Nomarski optikával készített felvételek

Nagy nagyítású képek készítéséhez Olympus BX51 típusú fluoreszcens feltétell ellátott, DIC (differential interference contrast) optikával rendelkező fénymikroszkópot (F-View (Soft Imaging System, 10x); Olympus PlanApo 60x/1,40 Oil Ph3 $\infty/0,17$ objektívek; Olympus U-RFL-T Hg-lámpa és ex HQ470/40, DM Q495LP, em HQ515/30 filterek) használtunk. A képeket alysis PRO 3.2 szoftver (Soft Imaging System GmbH) segítségével készítettük. Az állatokat tárgylemezen, 4%-os agarpadon vizsgáltuk, desztillált vízben, M9-ben vagy 1 mM - 0,5 M-os levamizol (mozgásképtelenné teszi a fonálférgeket) oldatban.

Vulvaszám meghatározás, vulvaindukció vizsgálata

A kifejlett állatok multivulva fenotípusának jellemzése sztereomikroszkóp és fénymikroszkóp segítségével történt. Sztereomikroszkóppal a különböző genetikai hátterű állatokban megszámláltuk a

vulvák, illetve a vulva-eredetű képződmények számát. A vulva fenotípusok statisztikus analízisét és összehasonlítását (X^2 próba) a VassarStats (<http://vassarstats.net/tab2x2.html>) weboldalon végeztük.

Az episztázis során nyert adatok megerősítésének céljából elvégeztük az indukált VPC (vulva precursor cells, vulva prekursor sejt) szám meghatározást is Nomarski optika segítségével L3 lárvastádiumban meghatároztuk, hogy a P3.p-P8.p sejtek osztódtak-e, vagyis meghatároztuk a P3.px-P8.px utódsejtek számát. P6.p esetében meg tudtuk vizsgálni a P6.pxx sejtek keletkezését marker segítségével is (*egl-17::gfp*).

Az L4 vulvát alkotó sejtek vizsgálata *ndk-1(ok314)* mutánsok esetében

Fénymikroszkópos vizsgálataink során megszámloltuk az *ndk-1(ok314)* mutáns állatokban – specifikus markerek segítségével – a vulvát alkotó sejteket. A CDH-3::GFP és az EGL-17::GFP markerek használatkor a vad típusú L4 stádiumra jellemző „karácsonyfa” alakot mutató vulvát elemeztük, míg a ZMP-1::GFP illetve a DHS-31::YFP esetén a felnőtt állatokét.

A disztális csúcsi sejtek (DTC-k) migrációjának vizsgálata

A DTC-k útja jól követhető (és utólag is jellemezhető) az általuk vezetett gonád alakját megnézve, melynek csúcsi részén helyezkedik el. A vizsgálathoz paralizált felnőtt egyedeket használtunk. A vad típusú gonád alatt azt értjük, amikor a DTC pontosan a vulváig vándorol. Alulmigrációt állapítottunk meg abban az esetben, ha a DTC (a gonád csúcsi része) nem érte el a vulvát, túlmigrálónak osztályoztuk akkor, hogyha túlhaladt azon. Az „extra kanyar” kategóriába soroltuk azokat a hermafroditákat, melyek gonádjában több, mint egy teljes kanyart figyeltünk meg. Az „egyéb” kategóriába osztályoztunk minden olyan vad típustól eltérő gonádot, amelyik egyik fent említett típusnak sem felelt meg (pl.: rossz irányultság, a kanyar hiánya, extra gonádkar, furcsa kanyarok és bejárt út). Az *ndk-1* gént RNSi-val csendesített mutánsok esetén olyan steril felnőtt egyedeket tanulmányoztunk, melyek kitüremkedő vulvával rendelkeztek. A statisztikai analízis kivitelezéséhez a DTC migrációs fenotípusokat három csoportba osztottuk: alulmigráció, vulváig tartó migráció és túlmigráció (ide soroltuk a vulván túlmenő és az extra kanyarral rendelkező mutánsokat is). Az „egyéb” kategóriába tartozó állatokat nem értékeltük a statisztikai elemzés során, mivel nagyon széles spektrumú eltéréseket mutattak és semmilyen „nagy” kategóriába nem voltak besorolhatóak, továbbá arányuk nem érte el a 10%-ot egyik mutáns populációban sem. A DTC migráció zavarainak páronkénti összehasonlításából származó *p-értékeket* Fisher-féle egzakt próbával számoltuk ki.

Az apoptotikus testek bekebelezésének vizsgálata

A bekebelezetlen apoptotikus testeket „comma” (vessző) állapotú embriókban számoltuk. Nomarski/DIC optikával nagy nagyításon jól láthatóak, mint gombszerű refraktilis korongok. Az apoptotikus testek számának páronkénti összehasonlításából származó *p-értékeket* Student-féle *t*-próbával számoltuk ki.

ELŐZMÉNYEK

***nm23* ortológok**

A *C. elegans* genomjában konvencionális szekvenciaillesztési módszerek (BLAST) alkalmazásával három *nm23* ortológot (*F25H2.5*, *F55A3.6* és *Y48G8AL.15*) azonosított kutatócsoportunk. Az *F25H2.5* szekvenciája 65%-ban azonos és 85%-ban hasonló az NM23-H1 és NM23-H2 fehérjékkel. A szekvenciális egyezéseken alapulva, az *F25H2.5* gént *ndk-1*-nek (a *nucleoside-diphosphate kinase-1 C. elegans* ortológja) neveztük el.

Az *ndk-1(ok314)* mutáció molekuláris háttere

Az *ok314* egy deléciós allél, mely a teljes *ndk-1* ORF-en túlmenően az 5' és 3' szabályozó régiókat is érinti.

Az *ndk-1* gén expressziójának vizsgálata

Az NDK-1 expresszióját három törzsben is megvizsgáltuk (BC12969, TTV2 és TTV3). Ezek közül a TTV2 és TTV3 törzsekben ugyanaz a transzgenikus konstrukció található meg. A transzkripcionális BC12969 és a transzlációs *gfp*-jelölésű konstrukciót tartalmazó TTV2 törzs analízise során a teljes egyedfejlődés során tapasztaltunk expressziót, egészen embrionális kortól mind a négy lárvastádiumban. A felnőtt egyedekben a következő szövetekben figyeltünk meg GFP-expressziót: hipodermisz, a hasdúclánc neuronjai, bél, testfalizomzat, fej és farok. Kiemelném az L3-L4 lárvastádiumokban a fejlődő vulvában megfigyelhető expressziót.

Az *ndk-1(ok314)* mutánsok gonádjának citológiai vizsgálata

Az *ok314* állatok gonádjában csak mitotikus zóna volt megfigyelhető, az oociták érési folyamata tehát már a meiotikus fázisba való belépés előtt megreked. Továbbá az *ok314* mutánsok gonádja nem mutatott aktivált MAPK festődést.

Az *ndk-1(RNSi)* állatok csíravonalában felhalmozódnak az apoptotikus testek

Az *ndk-1(RNSi)* állatok gonádját Nomarski (DIC) optikával vizsgálva összetett fenotípust figyelhetünk meg. A csökkent DTC migráción túlmenően sok vakuólát és nem differenciálódott sejtet láthatunk, esetenként elhalt embriókat, és azt is észrevehetjük, hogy a csökkent vagy az NDK-1 aktivitást teljesen nélkülöző állatok csíravonalában több apoptotikus test halmozódik fel.

A DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Az *ndk-1(ok314)* mutáció okozta Ndk-1 fenotípusok menekítése

- MosSCI módszerrel egy kópiában integráltuk az *ndk-1::gfp* transzgént a *C. elegans* genomjába, ami expresszáldott a csíravonalban is és menekítette a mutáns fenotípusokat.

Az *ndk-1* aktiválja a Ras útvonalat a vulvafejlődés során

- Az *ndk-1* gén expressziója már a vulva kialakulásának korai szakaszától megfigyelhető a szervben.

Az *ndk-1(-)* mutánsok rendellenes vulvafejlődése

- Specifikus markerek (*cdh-3::gfp*, *egl-17::gfp*, *zmp-1::gfp* és *dhs-31::gfp*) segítségével megállapítottuk, hogy az *ndk-1(ok314)* állatok kitüremkedő vulvájából nemcsak 2^o, hanem 1^o sejtsorsú sejtek is hiányoznak.
- Megszámoltuk az *ndk-1(ok314)* mutánsok vulváját alkotó sejteket, és átlagosan 20±1 sejtet találtunk (a vad típusban megfigyelhető 22-höz képest).
- Jelentős eltérést tapasztaltunk *ndk-1(-)* mutáns háttérben a vad típusú expresszióhoz képest: jelentősen lecsökkent vagy teljesen hiányzott a RAS/MAPK jelátvitel célgénjének, az FGF ligandumot kódoló *egl-17* génnek az expressziója az *ndk-1(ok314)* állatok P6.pxx sejtjeiben.
- Ezen adatok, továbbá az alapján, hogy már (késői) L3 stádiumtól azonosítottunk erős NDK-1 expressziót a vulvaszövetben, arra következtettünk, hogy az NDK-1 szükséges lehet a megfelelő vulvasejtsorsok kialakításában.

Az NDK-1 downstream vagy paralel hat a LIN-45/Raf-tól és upstream a MEK-2-től és MPK-1-től a vulvafejlődés során

- Az *ndk-1(ok314);let-23(n1045)* kettős mutánsok 100%-ban Vul fenotípusúak, továbbá az *ndk-1(-);let-23(-)* kettős mutánsok 43%-a megrekedt valamelyik lárvastádiumban (L1-L3).
- Az *ndk-1* gén *ok314* mutációja szignifikánsan csökkentette a vulvák számát (Muv, multivulva fenotípus) a *let-23/EGFR* és a *let-60/RAS* és *lin-45/Raf* funkciónyerékes mutánsokban.

- A *mek-2/MEK* és *mpk-1/MAPK* gének túlzott kifejeződése folytán kialakult Muv fenotípust azonban nem szuppresszálta az *ndk-1(ok314)* delécio, csakúgy, mint a *lin-1/ELK-1* és *lin-31/FoxB2* MAPK target gének hiánya okozta Muv fenotípust sem.
- Az *ndk-1(ok314)* mutánsokban megmértük a difoszforylált MAPK szintet. A *C. elegans*ban meglévő két izoforma közül a csíravonal-specifikus izoforma teljesen hiányzott a mutáns nematódákból. Az aktivált szomatikus MAPK-szint – de nem az alap fehérjeszint – pedig jelentősen lecsökkent az *ok314* delécio hatására.
- Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy az *ndk-1* valószínűleg a *mek-2* és *mpk-1* jelátviteli komponensektől upstream, míg a *lin-45* géntől downstream funkcionál, továbbá, hogy az *ndk-1* a Ras/MPK-1 szignalizáció teljes aktivációjához, de nem a kialakulásához szükséges.

A Ksr-1 és Ksr-2 fenotípusok felerősödnek *ndk-1(ok314)* mutáns háttérben, ami az *ndk-1* és a *ksr* paralógok közötti genetikai interakcióra utal

- A *ksr-1* mutánsok 33%-ában jelenlévő Egl fenotípus 77%-ra nőtt az *ndk-1(ok314)/+* heterozigóta; *ksr-1(n2526)* törzsben. Vizsgálataink arra világítottak rá, hogy ezekben az állatokban a vulvafejlődés ugyan rendellenes, de nem súlyosabb az *ndk-1(-)* egyszeres mutánsokéhoz képest, hanem ahhoz hasonló.
- Az *ndk-1(-)* egyszeres mutánsokban alacsony penetranciával mutakozó Clr (Clear, átlátszó) és Con (constipation, székrekedéses) fenotípusok 100%-os penetranciával jelentek meg az *ndk-1(ok314) ksr-2(dx27)/+ ksr-2(dx27)* állatokban, továbbá az *ndk-1(-) ksr-2(-)* kettős mutánsok nem életképesek.
- MBP pulldown kísérlet segítségével sikerült is kimutatnunk fizikai interakciót a *C. elegans* KSR-2 és az egér KSR-1 fehérjék és az NDK-1 között. Mindezek fényében az NDK-1 a megfelelő MAPK szintet valószínűleg a KSR fehérjék direkt szabályzásán keresztül alakítja ki.

Az NDK-1 szabályozza a sejt vándorlást

A *C. elegans* FLAG::NDK-1 csökkentette az MDA-MB-231 sejtek motilitását

- FLAG::NDK-1, FLAG::NM23-H1 és MYC-NM23-H2 konstrukciókkal transzfektáltuk az MDA-MB-231T adenokarcinóma sejteket és stabil vonalakat állítottunk elő migrációs vizsgálatokhoz.
- Az MDA-MB-231T kontroll klónok vándorlási képességéhez képest a nematóda vagy humán NM23 homológot overexpresszáló klónok migrációs potenciálcsökkenése elérte vagy meg is haladta az 50%-ot.

Az *ndk-1(lf)* mutánsokban a DTC-k által bejárt útvonal rövidebb

- az *ndk-1(ok314)* állatok gonádja rövidebb a vad típusú állatokéhoz képest, ami DTC migrációs zavarokra utal.
- 318 Pvl, steril hermafrodita gonádjának részletes elemzése alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az *ok314* mutáció hatására a DTC-k nem járják be a vad típusra jellemző teljes útvonalat, még azelőtt befejezik vándorlásukat, hogy elérnének a vulvához.
- L3 stádiumtól kezdődően tudtunk NDK-1::GFP expressziót azonosítani a DTC-kben, így valószínűleg az NDK-1 hiánya sejtautonóm módon idézi-e elő a DTC-k vándorlási zavarait.

Az *ndk-1(-)* szuppresszálja a CED-10 útvonal mutánsainak jellegzetes fokozott migrációs fenotípusát, az *abi-1* helyreállítja az Ndk-1 DTC migrációs fenotípusát

- Az *ndk-1* hiánya szuppresszálta a CED-10 útvonal tagjainak, a *vab-3*, *ina-1*, *unc-73*, *mig-2*, *ced-5*, *ced-12* és *ced-10* mutánsoknak a jellegzetes extra kanyarokkal rendelkező gonádfenotípusát és Ndk-1-szerű gonádot (kisebb gonádot kevesebb extra kanyarral) eredményezett.
- A CED-10 útvonallal párhuzamosan ható ABL-1/ABI-1 útvonal *abl-1 ok171* mutációja az *ndk-1(ok314)* DTC migrációs fenotípusára nem volt hatással.
- Az *abl-1(ok171)* mutációval ellentétben azonban az *abi-1(ok640)* képes volt helyreállítani az *ndk-1(ok314)* állatok 37%-ában a DTC vándorlási fenotípust, azt sugallva, hogy az *ndk-1* esetleg upstream hat az *abi-1*-től, vagy hogy az ABI-1 hiánya kompenzálja az NDK-1 hiányát, a két gén paralel hatását feltételezve.
- Ezen eredményeink alapján azt gondoljuk, hogy az *ndk-1* a *ced-10/Rac*-tól downstream vagy paralel, míg az *abi-1/Abi*-tól upstream vagy paralel hat a DTC migrációban.

Az NDK-1 szabályozza az apoptotikus testek bekebelezését

ndk-1(-);abi-1(-) kettős mutánsok additív Ced fenotípusúak, azt sugallva, hogy az NDK-1 downstream hat a CED-10-től és paralel az ABI-1-hez képest

- A TTV3 transzgenikus törzs hermafroditáinak izolált gonádjában észleltünk NDK-1::GFP expressziót a pusztuló meiotikus csírasejtek körüli, azok eltakarításáért felelős gonádhüvely sejtekben
- Megközelítőleg kétszer annyi pusztuló apoptotikus sejtet (corpsot) azonosítottunk az *ndk-1(-)* mutáns embriókban, mint a vad típusúakban.
- Az *ndk-1(ok314);ced-10(n1993)* embriókban átlagosan ugyanannyi apoptotikus testet számoltunk, mint ami a *ced-10(n1993)* egyszeres mutánsokban is található.

- Az *ndk-1(ok314);abi-1(ok640)* kettős mutánsokban mindkét egyszeres mutánshoz képest megemelkedett számú apoptotikus testet találtunk (additív fenotípus), ami paralel episztatikus viszonyra utal.
- Az apoptotikus testek bekebelezésben végzett vizsgálataink tehát pontosították a DTC vándorlás során kapott eredményeinket, és összevetve őket egymással, azt gondoljuk, hogy az *ndk-1* párhuzamosan hat az *abi-1*-hez képest és downstream a *ced-10*-től.

Az *ndk-1(ok314)* embriók a *dyn-1(-)* mutánsokra jellemző embrionális fenotípust mutatják: késői embrionális letalitást tartósan jelenlévő apoptotikus testekkel

- Az *ndk-1(ok314)* homozigóták 50%-a meghal embrióként, méghozzá ezek az embriók Dyn-1-szerű késői embrióletalitást mutatnak, azaz késői (4-fold) stádiumban pusztulnak el és bennük perzisztálnak az apoptotikus testek.
- egy termoszenzitív *dyn-1* allél, a *ky51* felhasználásával *dyn-1(ky51);ndk-1(ok314)/+* kettős mutáns törzset állítottunk elő
- A restriktív hőmérsékleten nem figyeltünk meg egyetlen Pvl, Ste (kettős mutáns) egyed sem a *dyn-1(ky51);ndk-1(ok314)/+* törzs F1 nemzedékében. Permisszív hőmérsékletre téve az állatokat azonban a Pvl, Ste fenotípus megjelent az F2 generációban.
- Ezek a megfigyeléseink azt sugallják, hogy a kettős mutánsok nem életképesek, továbbá arra is utalnak, hogy *C. elegans*ban (is) létezik geneikai kölcsönhatás az *ndk-1* és *dyn-1* között.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az *nm23* (non-metastatic) géncsalád tagjai számos folyamatot – köztük sejtmigrációt, proliferációt és differenciációt – szabályoznak, azonban a háttérben húzódó molekuláris mechanizmusokról még mindig keveset tudunk. Doktori munkám célja az *nm23* biológiai funkcióinak jobb megértése volt, az *nm23-H1/H2* *C. elegans* ortológjának, az *ndk-1* génnek szerepét vizsgálva az egyedfejlődés különböző folyamataiban.

Elsőként az *ndk-1* Ras/MAPK (mitogen-activated protein kinase) útvonalban betöltött szerepét elemeztük. Az *ndk-1* null mutánsoknak kitüremkedő vulvájuk van (protruding vulva, Pvl) és bennük az elsődleges és másodlagos vulvasejtvonalak is abnormálisan alakulnak ki. *ndk-1(-)* nematódákban a szomatikus aktivált MAPK szintje a vad típusú állatokhoz képest jelentősen alacsonyabb. A vulvaindukciós rendszerben végzett episztázis analízisünk alapján az NDK-1 a LIN-45/Raf-tól downstream, míg a MPK-1/MAPK-tól upstream hat, a KSR (kinase suppressors of ras) állványfehérjék fehérjék szintjén. *In vivo* először igazoltuk, hogy az NDK-1 a KSR1/2-vel kölcsönhatva befolyásolja a

Ras/MAPK jelátvitelt. A fonálféreg vulvafejlődése során az NDK-1 szükséges a Ras/MAPK jelátvitel teljes aktiválásához.

További kísérleteinkben a pleiotróp hatású *ndk-1* gén szerepét a gonád disztális csúcsi sejteinek (distal tip cell, DTC) vándorlásában vizsgáltuk. A DTC migráció dorzális fázisában kulcsszerepet töltenek be az integrin jelátvitel génjei. Fenotípusos elemzésünk során azt találtuk, hogy az *ndk-1(-)* mutánsok csökkent DTC migrációt mutatnak, és migrációjuk legtöbbször a dorzális fázisban reked meg. Az integrin útvonal mutánsaival végzett episztázis analízis alapján valószínűsítettük, hogy az NDK-1 a CED-10/Rac-tól downstream funkcionál a disztális csúcsi sejtek vándorlásában.

A DTC migráció és az apoptotikus testek bekebelezése (engulfment) analóg folyamatok, mindkettőt részben a CED-10 útvonal szabályozza. Kimutattuk, hogy az *ndk-1* mutánsokban felhalmozódnak az apoptotikus testek, és az NDK-1 expresszáldódik a gonád apoptózissal elpusztuló csírasejteinek eltávolításáért felelős toksejtjeiben. Az apoptotikus fenotípusokon alapuló episztázis elemzésünk megerősítette az *ndk-1* helyzetét a *ced-10*-től downstream. Továbbá genetikai kölcsönhatást figyeltünk meg az NDK-1 és az engulfment során a membrán átrendeződésekben fontos szerepet játszó DYN-1/dynamin között, ami a CED-10-zel paralel útvonalban hat. Összességében egy új kontextusban értelmeztük az NDK-1/NM23 szerepét, először társítottuk az apoptotikus sejtek bekebelezésének és eltávolításának folyamatához.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

FANCSALSZKY L, MONOSTORI E, FARKAS Z, POURKARIMI E, MASOUDI N, HARGITAI B, BOSNAR MH, DEŽELJIN M, ZSÁKAI A, VELLAI T, MEHTA A, TAKÁCS-VELLAI K.: NDK-1, the homolog of NM23-H1/H2 regulates cell migration and apoptotic engulfment in *C. elegans*. *PLoS One*. 9(3):e92687. (2014)

MASOUDI N, FANCSALSZKY L, POURKARIMI E, VELLAI T, ALEXA A, REMÉNYI A, GARTNER A, MEHTA A, TAKÁCS-VELLAI K: The NM23-H1/H2 homolog NDK-1 is required for full activation of Ras signaling in *C. elegans*. *Development*, 140:3486–3495. (2013)

Konferencia prezentációk a doktori tézis témakörében

9th International Congress of the NDP Kinase/Nm23/awd Gene Family - A new frontier in cell and cancer biology; July 31 - August 4, 2013; Boston University, Boston, Massachusetts, USA; előadás; Neda Masoudi, **Luca Fancsalszky**, Ehsan Pourkarimi, Tibor Vellai, Anita Alexa, Attila Reményi, Anton Gartner, Anil Mehta, Krisztina Takács-Vellai: The Nm23-H1/H2 homolog NDK-1 is required for full activation of Ras signaling in *C. elegans*

9th International Congress of the NDP Kinase/Nm23/awd Gene Family - A new frontier in cell and cancer biology; July 31 - August 4, 2013; Boston University, Boston, Massachusetts, USA; előadás; **Luca Fancsalszky**, Ehsan Pourkarimi, Neda Masoudi, Maja Herak Bosnar, Zsolt Farkas, Tibor Vellai, Anil Mehta, Krisztina Takács-Vellai: Modelling metastatic inhibition: *ndk-1/nm23-H1/H2* regulates distal tip cell (DTC) migration in *C. elegans*

IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011. március 25-27., előadás; **Fancsalszky Luca**, Neda Masoudi, Ehsan Pourkarimi, Vellai Tibor, Anil Mehta, Anton Gartner, Alexa Anita, Reményi Attila, Takács-Vellai Krisztina: Az *nm23-H1/H2* ortológ *ndk-1* aktiválja a RAS/MAPK jelátviteli útvonalat a *C. elegans* vulva- és gonádfejlődése során

IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011. március 25-27., poszter; Monostori Eszter, **Fancsalszky Luca**, Vellai Tibor, Takács-Vellai Krisztina: Az *nm23-H1/H2* ortológ *ndk-1* szerepe a sejtmigrációban a *C. elegans* egyedfejlődése során

8th International Congress of the NDP Kinase/Nm23/awd Family - From Basic Science to Clinical Application - 25. - 28. Oct. 2010 Heidelberg, Germany, előadás; Neda Masoudi, Ehsan Pourkarimi, Luca Fancsalszky, Tibor Vellai, Anil Mehta, Anton Gartner, Krisztina Takács-Vellai: The *C. elegans nm23-H1/2* orthologue *ndk-1* activates RTK/Ras/MAPK signaling during gonad and vulval development

2010. - Genetikai Műhelyek Magyarországon 9. - minikonferencia, MTA SZBK Szeged, Szept. 3., előadás; Neda Masoudi, **Luca Fancsalszky**, Ehsan Pourkarimi, Tibor Vellai, Anita Alexa, Attila Reményi, Anton Gartner, Anil Mehta, Krisztina Takács-Vellai: A *C. elegans nm23-H1/2* ortológ *ndk-1* szerepe az RTK/ Ras/MAPK jelátvitelben a gonád és a vulva fejlődése során

***C. elegans*: Development and Gene Expression** EMBL Heidelberg, Germany 17 June - 20 June 2010, poszter; Neda Masoudi, **Luca Fancsalszky**, Ehsan Pourkarimi, Tibor Vellai, Anita Alexa, Attila Reményi, Anton Gartner, Anil Mehta, Krisztina Takács-Vellai: The Nm23-H1/H2 homologue NDK-1 activates Ras/MAPK signaling interacting with kinase scaffold of Ras during vulval development in *C. elegans*